

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/001407

International filing date: 07 February 2005 (07.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP  
Number: 04090037.5  
Filing date: 05 February 2004 (05.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 16 March 2005 (16.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

07.02.2005

**Europäisches  
Patentamt****European  
Patent Office****Office européen  
des brevets****Bescheinigung****Certificate****Attestation**

Die angehefteten Unterla-  
gen stimmen mit der  
ursprünglich eingereichten  
Fassung der auf dem näch-  
sten Blatt bezeichneten  
europäischen Patentanmel-  
dung überein.

The attached documents  
are exact copies of the  
European patent application  
described on the following  
page, as originally filed.

Les documents fixés à  
cette attestation sont  
conformes à la version  
initialement déposée de  
la demande de brevet  
européen spécifiée à la  
page suivante.

**Patentanmeldung Nr.    Patent application No.    Demande de brevet n°**

04090037.5

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

**R C van Dijk**





Anmeldung Nr:  
Application no.: 04090037.5  
Demande no:

Anmeldetag:  
Date of filing: 05.02.04  
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Epigenomics AG  
Kastanienallee 24  
10435 Berlin  
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:  
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.  
If no title is shown please refer to the description.  
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

Verwendung von nicht-methylierter DNA als Kontroll- und Kalibrierungsstandard

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)  
revendiquée(s)  
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/  
Classification internationale des brevets:

G12Q1/68

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of  
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL  
PT RO SE SI SK TR LI



**Titel**

Verwendung von nicht-methylierter DNA als Kontroll- und  
Kalibrierungsstandard

## Hintergrund der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von DNA, in der 5-Methylcytosin nicht auftritt. Solche nicht-methylierte DNA ist insbesondere als Kontrolle für eine verlässliche und sensitive Analyse von Cytosinmethylierungen erforderlich.

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt eine wichtige biologische Rolle, u.a. bei der Transkriptionsregulation, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese (zur Übersicht: Millar et al.: Five not four: History and significance of the fifth base. In: The Epigenome, S. Beck and A. Olek (eds.), Wiley-VCH Verlag Weinheim 2003, S. 3-20). Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichen Interesse. Ein Nachweis der Methylierung ist allerdings schwierig, da Cytosin und 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweisen. Viele der herkömmlichen, auf Hybridisierung beruhenden Nachweisverfahren vermögen daher nicht zwischen Cytosin und Methylcytosin zu unterscheiden. Zudem geht die Methylierungsinformation bei einer PCR-Amplifikation vollständig verloren.

Die herkömmlichen Methoden zur Methylierungsanalyse arbeiten im wesentlichen nach zwei unterschiedlichen Prinzipien. Zum einen werden methylierungsspezifische Restriktionsenzyme benutzt, zum anderen erfolgt eine selektive chemische Umwandlung von nicht-methylierten Cytosinen in Uracil (sog.: Bisulfit-Behandlung, siehe etwa: DE

101 54 317 A1; DE 100 29 915 A1). Die enzymatisch oder chemisch vorbehandelte DNA wird dann meist amplifiziert und kann auf unterschiedliche Weise analysiert werden (zur Übersicht: WO 02/072880 S. 1 ff). Von großem Interesse sind dabei Verfahren, die in der Lage sind, Methylierung sensitiv und quantitativ zu detektieren. Dies gilt aufgrund der wichtigen Rolle der Cytosin-Methylierung in der Krebsentstehung insbesondere in Hinblick auf diagnostische Anwendungen. Die herkömmlichen Verfahren gewährleisten eine sensitive und quantitative Methylierungsanalyse bisher nur beschränkt.

Zur sensitiven Analyse wird die chemisch vorbehandelte DNA üblicherweise mittels eines PCR-Verfahrens amplifiziert. Über die Verwendung methylierungsspezifischer Primer oder Blocker wird dann eine selektive Amplifikation nur der methylierten (bzw. bei umgekehrten Ansatz: unmethylierten) DNA gewährleistet. Der Einsatz methylierungsspezifischer Primer ist als sog. „methylierungssensitive PCR“ bekannt („MSP“; Herman et al.: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Sep 3;93(18):9821-6). Ein vergleichbar sensitives Verfahren ist die sogenannte „Heavy Methyl“-Methode. Dabei wird eine spezifische Amplifizierung nur der ursprünglich methylierten (bzw. unmethylierten) DNA durch Einsatz von methylierungsspezifischen Blocker-Oligomeren erreicht (zur Übersicht: WO 02/072880; Cottrell et al.: A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. Nucl. Acids. Res. 2004 32: e10). Sowohl MSP wie Heavy Methyl sind auch als quantifizierbare Real-Time-Varianten anwendbar. Diese ermöglichen es, den Methylierungsgrad zu bestimmen.



rungsstatus von Positionen direkt im Verlauf der PCR nachzuweisen, ohne dass eine nachfolgende Analyse der Produkte erforderlich wäre („MethyLight“ - W000/70090; US 6,331,393).

5

Eine verlässliche Quantifizierung des Methylierungsstatus über einen linearen Bereich ist mit den oben beschriebenen Verfahren bisher jedoch nur begrenzt möglich. Hierfür ist erforderlich, dass die Assays sowohl mit vollmethylierter wie auch mit nicht-methylierter DNA kalibriert werden (vgl.: Trinh et al.: DNA methylation analysis by MethyLight technology. Methods. 2001 Dec; 25(4): 456-62). Die Herstellung vollmethylierter DNA ist relativ einfach über die Verwendung der SssI-Methylase möglich. Dieses Enzym überführt im Sequenzkontext CG alle nicht-methylierten Cytosine in 5-Methylcytosin. Problematisch ist allerdings die Herstellung von vollständig nicht-methylierter DNA. Denn ein der SssI-Methylase entsprechendes Enzym, das quantitativ alle Methylgruppen entfernt, steht nicht zur Verfügung. Bisher wird zur Kalibrierung Sperma-DNA verwandt, die über einen geringen Methylierungsgrad verfügt (vgl.: Trinh et al. 2001, a.a.o.). Gleichwohl ist die Sperma-DNA teilweise methyliert und eignet sich daher als verlässlicher Standard nur bedingt. Auch künstlich hergestellte, kurze unmethylierten Sequenzen wie PCR-Amplifikate sind nur begrenzt einsetzbar, etwa für die Analyse einzelner, definierter Positionen. Für Multiplex-Reaktionen können diese Standards nicht verwendet werden, da die Komplexität der Reaktion dann zu hoch wäre. Zudem erfordert die Entwicklung eines jeden neuen Nachweis-Assays die Herstellung eines neuen definierten Standards. Dagegen würde ein unmethylierter

30

Standard, der die gesamte genomischen DNA oder einen representativen Teil hiervon abdeckt, eine zuverlässig quantifizierbare Methylierungsanalyse erlauben. Zudem wäre eine standardisierte und damit einfache, kostengünstige und schnelle Entwicklung neuer Nachweisassays möglich. Aufgrund der besonderen biologischen und medizinischen Bedeutung der Cytosin-Methylierung und aufgrund der oben erwähnten Nachteile der zur Zeit verwendeten Standards besteht ein großes technisches Bedürfnis an Methoden, die genomische DNA in vollständig nicht-methylierter Form zur Verfügung stellen. Im folgenden ist ein solches - überraschend einfaches - Verfahren beschrieben.

Erfindungsgemäß werden zur Herstellung nicht-methylierter DNA sogenannte genomweite Amplifikationsverfahren verwendet (WGA - whole genome amplification, zur Übersicht: Hawkins et al.: Whole genome amplification--applications and advances. Curr Opin Biotechnol. 2002 Feb; 13(1): 65-7). In diesen Verfahren wird ein großer Teil der genomischen DNA mittels einer DNA-Polymerase und „Random“- oder degenerierter Primer vervielfältigt. Dabei werden in den Amplifikationen nur nicht-methylierte Cytidintriphosphate angeboten, so dass die Amplifikate vollständig unmethyliert synthetisiert werden. Nach mehreren Amplifikationsrunden tritt die Menge der partiell methylierten Matrizen-DNA im Vergleich zu den neu hergestellten, nicht-methylierten Nukleinsäuren vollständig in den Hintergrund.

Bisher sind unterschiedliche WGA-Verfahren beschrieben. Bei der sog. Primer-Extensions-Präamplifikation (PEP: primer extension preamplification) wird die Amplifikation

mittels einer Taq-Polymerase und einer zufälligen Mischung von Oligonukleotidprimern mit einer Länge von etwa 15 Nukleotiden durchgeführt (Zhang et al.: Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jul 1; 89(13): 5847-51). Bei der DOP-PCR (degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction) wird dagegen nur ein degenerierter Primer eingesetzt (vgl.: Telenius et al.: Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. Genomics. 1992 Jul; 13(3): 718-25). Ein weiteres WGA-Verfahren ist die sog. Linker-Adaptor-PCR. Dabei wird die DNA zunächst mittels eines Restriktionsenzymys verdaut. Anschließend werden an die Restriktionsfragmente Linker ligiert. In der folgenden Amplifikation werden Primer eingesetzt, die spezifisch an die Linker binden (zur Übersicht: Cheung and Nelson: Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Dec 10; 93(25): 14676-9 m.w.N.). Die oben beschriebenen, auf PCR-basierenden WGA-Verfahren haben allerdings mehrere Nachteile. So kann es etwa zur Generierung unspezifischer Amplifikationsartefakte kommen. Zudem erfolgt oft nur eine unvollständige Abdeckung aller Genombereiche. Weiterhin entstehen teilweise nur kurze DNA-Fragmente mit einer Länge von weniger als 1 kB. (vgl.: Dean et al.: Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Apr 16; 99(8): 5261-6 m.w.N.). Das zur Zeit schlagkräftigste Verfahren zur genomweiten Amplifikation ist daher die isotherme "Multiple Displacement Amplification"

(MDA, vgl.: Dean et al. 2002 a.a.o.; US Patent 6,124,120). Hierbei wird die genomische DNA mit „Random“-Primern und eine DNA-Polymerase umgesetzt. Es werden dabei Polymerasen eingesetzt, die in der Lage sind, den Nicht-Template-Strang des DNA-Doppelstrangs während der Amplifikation zu verdrängen (etwa eine  $\phi$ 29 Polymerase). Die verdrängten Stränge dienen wiederum als Matrize für die Extension weiterer Primer. Mit diesem Verfahren ist es möglich, aus nur 1-10 Kopien menschlicher genomischer DNA etwa 20-30  $\mu$ g DNA herzustellen. Dies entspricht einer mehr als 5000-fachen Amplifikation. Die durchschnittliche Produktlänge beträgt dabei mehr als 10 kB, wobei die Amplifikation relativ gleichmäßig über das gesamte Genom erfolgt. Die Reaktion kann direkt aus biologischen Proben erfolgen, etwa aus Blut oder Zellkulturen. Kommerzielle Kits zur MDA sind zur Zeit über zwei Anbieter verfügbar („GenomiPhi“ von Amersham Biosciences, [www4.amershambiosciences.com](http://www4.amershambiosciences.com); „Repli-g“ von Molecular Staging, [www.molecularstaging.com](http://www.molecularstaging.com)). Auch bereits amplifizierte DNA ist über diese Anbieter erhältlich. Die mittels MDA hergestellte DNA wird in vielfältigen Anwendungen eingesetzt, etwa im Genotyping von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP), im „Chromosomen-Painting“, in der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismusanalyse, in der Subklonierung und in der DNA-Sequenzierung. Die MDA ist so insbesondere für genetische, forensische und diagnostische Untersuchungen verwendbar (vgl.: Dean et al. 2002, a.a.o.).

Die Verwendung von durch WGA-Methoden hergestellten DNA als Standard in Verfahren zum Nachweis von 5-Methylcytosin ist bisher noch nicht bekannt. Die im fol-

genden genauer beschriebenen Anwendungen eröffnen der Methylierungsanalyse daher erstmals Zugang zu genomischer, nicht-methylierter DNA. Aufgrund der besonderen Bedeutung der Cytosinmethylierung und aufgrund der beschriebenen Nachteile des Standes der Technik stellt das Eröffnen dieser vorteilhaften, neuen Technologie einen wichtigen technischen Fortschritt dar.

## 10 **Beschreibung**

Erfindungsgemäß wird die durch genomweite Amplifizierungsverfahren hergestellter DNA als Standard in der Methylierungsanalyse verwendet. Erfindungsgemäß ist weiterhin ein Verfahren zur Methylierungsanalyse, das dadurch gekennzeichnet ist, dass

- a) eine genomweite Amplifikation durchgeführt wird,
- b) die Amplifikate in der Methylierungsanalyse als Standard verwendet werden.

20 Prinzipiell können erfindungsgemäß alle oben beschriebenen WGA-Verfahren eingesetzt werden. Die Reaktionsbedingungen der PEP, DOP-PCR und Linker-PCR gehören zum Stand der Technik (s.o.). Aufgrund der oben beschriebenen Nachteile der auf PCR basierenden WGA-Verfahren wird erfindungsgemäß bevorzugt eine MDA durchgeführt. Auch die Reaktionsbedingungen für ein MDA-Verfahren sind hinreichend bekannt (vgl.: Dean et al 2002, a.a.o.; US-Patent 6,124,120; 6,280,949; 6,642,034; US-Anmeldung 2003/0143536; Produktinformationen zu den oben erwähnten Genomiphi und Repli-g-Kits). Auch andere Variationen der WGA, insbesondere des MDA-Verfahrens, können erfindungsgemäß zur Herstellung nicht-methylierter DNA verwendet werden. So ist es etwa möglich, die DNA zunächst zu fragmentieren und an die Fragmente Linker zu ligieren. Anschließend werden die Fragmente in Concatamere überführt, die dann über eine

MDA amplifiziert werden (multiple strand displacement amplification of concatenated DNA - MDA-CA ; vgl.: US 6,124,120).

5 Erfindungsgemäß bevorzugt wird jedoch eine herkömmliche MDA benutzt. Vorzugsweise werden zwei Sets von Primern verwendet. Jeweils ein Primerset ist komplementär zu ei-  
10 nen Strang der zu amplifizierenden DNA. Bei den Primer-sets kann es sich um Random-Primer oder degenerierte Primer handeln. Einzelheiten zur Anzahl, Länge und zur Struktur der Primer sind vielfach beschrieben (vgl.: US 6,124,120). So etwa bekannt, dass Primer verwendet werden können, die am 5'-Ende nicht komplementär zu der Zielse-  
15 quenz sind. Hiermit wird die Verdrängung der Primer durch die Polymerase erleichtert. Die 5'-Region der Primer kann zudem funktionale Sequenzen, etwa für einen Promotor tra-  
20 gen (vgl.: US 6,124,120). Der optimale Aufbau der Primer hängt von der Art der verwendeten Polymerase ab, insbe-sondere von ihrer Prozessivität (vgl.: US 6,124,120). Be-  
sonders bevorzugt werden Hexamer-Primer benutzt. Ver-  
25 schiedene Polymerasen sind in der MDA-Reaktion einsetz-bar. Die Enzyme müssen entweder alleine oder in Kombina-tion mit Hilfsfaktoren (etwa Helikasen) in der Lage sein, während der Replikation den Nicht-Matrizenstrand der zu replizierenden DNA-Doppelhelix zu verdrängen. Dabei wer-  
30 den bevorzugt Polymerasen eingesetzt, die über keine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität verfügen. Alternativ können al-lerdings auch Primer eingesetzt werden, die am 5'Ende blockiert und daher von den Polymerasen nicht degradier-bar sind. Als Polymerase wird besonders bevorzugt die  
35  $\phi$ 29-Polymerase verwendet. Diese verfügt über eine sehr hohe Prozessivität, die es ihr erlaubt, sehr effektiv DNA zu synthetisieren, auch wenn extreme Basenzusammensetzungen, kurze Tandemwiederholungen (short tandem repeats) oder Sekundärstrukturen in der DNA auftreten. In dem US-Patent 6124120 und in der US-Patenanmeldung 2003/0143536

A1 sind weitere einsetzbare Polymerasen aufgeführt, etwa Bst, Bca oder Phage M2-DNA-Polymerase. Die für die Amplifikation erforderlichen Reaktionsbedingungen sind von der Auswahl der Polymerasen und der Primer abhängig und ergeben sich ebenfalls aus den oben genannten Referenzen. Es ist u.a. auch bekannt, dass über unterschiedliche Methoden eine Detektion und Quantifizierung der amplifizierten DNA erreicht werden kann, etwa über den Einbau markierter Nukleotide, über Verwendung besonderer Detektionssonden oder über Festphasendetektoren (Vgl.: 6,124,120).

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die kommerziell erhältlichen Kits zur Synthese der nicht-methylierten DNA verwendet. Besonders bevorzugt werden die Kits „GenomiPhi“ (Amersham Biosciences) oder „Repli-g“ (Molecular Staging) verwendet. Die Amplifikation erfolgt dabei nach Herstellerangaben. Im wesentlichen wird dabei die zu amplifizierende DNA mit einem Probenpuffer und Random Hexamer Primern versetzt. Die Mischung wird hitzedenaturiert und anschließend gekühlt, so dass es zu einer Bindung der Primer an die DNA kommen kann. Danach werden die verbleibenden Reaktionskomponenten, insbesondere die Desoxynukleosidtriphosphate und die  $\phi$ 29-Polymerase hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wird dann für etwa 30 Stunden bei 30°C inkubiert. Als Ausgangsmaterial kann etwa DNA verwandt werden, die über die kommerziell verfügbaren Aufreinigungsmethoden isoliert wurde. Für zelluläre Proben wie Blutproben oder Primärzellen aus klinischen Proben kann auch eine alkalische Lyse mit nachfolgender Neutralisation ausreichend sein (vgl.: Produktinformation von Amersham zum GenomiPhi-DNA-Amplifikationskit).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird als Standard kommerziell erhältliche, über MDA hergestellte DNA verwendet (s.o.). Dies hat den Vorteil,

dass die DNA aufgrund der standardisierten Herstellungsprozesse von gleichbleibender Konzentration und Qualität ist.

- 5 Die über die oben beschriebenen Verfahren hergestellte oder käuflich erworbene DNA kann in einer Vielzahl von Methylierungsanalyseverfahren als Standard verwendet werden. Hierzu gehören sowohl Verfahren, die auf dem Einsatz von Restriktionsenzymen beruhen, wie auch Verfahren, die
- 10 auf einer Bisulfitbehandlung der DNA basieren (vgl.: Fra-  
ga and Esteller: DNA Methylation: A Profile of Methods  
and Applications. Biotechniques 33:632-649, September  
2002). Bevorzugt wird zunächst eine Bisulfitumwandlung  
durchgeführt. Die Bisulfitumwandlung ist dem Fachmann in
- 15 unterschiedlichen Variationen bekannt (siehe etwa: From-  
mer et al.: A genomic sequencing protocol that yields a  
positive display of 5-methylcytosine residues in indivi-  
dual DNA strands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Mar  
1;89(5):1827-31; Olek, A modified and improved method for
- 20 bisulphite based cytosine methylation analysis. Nucleic  
Acids Res. 1996 Dec 15;24(24):5064-6.; DE 100 29 915; DE  
100 29 915). Besonders bevorzugt erfolgt die Bisulfitum-  
wandlung in Gegenwart von denaturierenden Lösemitteln,  
etwa Dioxan, und eines Radikalfängers (vgl.: DE 100 29
- 25 915). In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird  
die DNA nicht chemisch, sondern enzymatisch umgewandelt.  
Dies ist etwa durch Einsatz von Cytidin-Deaminasen denk-  
bar, die unmethylierte Cytidine schneller umsetzen als me-  
thylierte Cytidine. Ein entsprechendes Enzym ist kürzlich
- 30 identifiziert worden (Bransteitter et al.: Activation-  
induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on



single-stranded DNA but requires the action of RNase.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 1;100(7):4102-7).

Die umgewandelte DNA kann anhand der gängigen molekular-  
biologischen Verfahren analysiert werden, etwa über Hybi-  
disierung oder Sequenzierung. In einer bevorzugten Vari-  
ante wird die umgewandelte DNA zunächst amplifiziert.  
Hierzu sind dem Fachmann unterschiedliche Verfahren be-  
kannt, etwa Ligasekettenreaktionen. Vorzugsweise wird die  
DNA allerdings über eine Polymerasereaktion amplifiziert.  
Hierzu sind verschiedene Ausgestaltungen denkbar, etwa  
die Verwendung isothermer Amplifikationsverfahren. Beson-  
ders bevorzugt sind allerdings Polymerasekettenreaktionen  
(PCR). In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungs-  
form erfolgt die PCR unter Verwendung von Primern, die  
spezifisch nur an Positionen der umgewandelten Sequenz  
binden, die vorher entweder methyliert oder (bei umge-  
kehrtem Ansatz) unmethyliert) waren (MSP, s.o.). In einer  
anderen ganz besonders bevorzugten Ausführungsform wird  
die umgewandelte DNA mit Hilfe von methylierungsspezifi-  
scher Blockern analysiert („Heavy-Methyl“-Methode, s.o.).  
Die Detektion der PCR-Amplifikate kann über herkömmliche  
Verfahren erfolgen, etwa über Methoden der Längenmessung  
wie Gelelektrophorese, Kapillargelelektrophorese und  
Chromatographie (z.B. HPLC). Auch Massenspektrometrie und  
Methoden zur Sequenzierung wie die Sanger-Methode, die  
Maxam-Gilbert-Methode und Sequencing by Hybridisation  
(SBH) können verwendet werden. In einer bevorzugten Aus-  
führungsform werden die Amplifikate durch Primer-  
Extension-Verfahren nachgewiesen oder durch methylie-  
rungsspezifische Ligationsverfahren (siehe etwa: Gonzalgo  
& Jones: Rapid quantitation of methylation differences at

specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). Nucleic Acids Res. 1997 Jun 15;25(12):2529-31; DE 100 10 282; DE 100 10 280). In einer anderen bevorzugten Ausführungsform werden die Amplifikate mittels Hybridisierung an Oligomer-Arrays analysiert (vgl.: Adorjan et al.: Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. Nucleic Acids Res. 2002 Mar 1; 30(5): e21). In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Amplifikate unter Verwendung von PCR-Real-Time-Varianten analysiert (vgl.: Heid et al.: Real time quantitative PCR. Genome Res. 1996 Oct;6(10):986-94, US Patent No. 6,331,393 „Methyl-Light“). Dabei wird die Amplifikation in Gegenwart eines methylierungsspezifischen, fluoreszenzmarkierten Reporteroligonukleotid durchgeführt. Das Reporteroligonukleotid bindet dann bevorzugt an die zu untersuchende DNA und zeigt deren Amplifikation durch Zunahme oder Abnahme der Fluoreszenz an. Dabei ist es besonders vorteilhaft, wenn die Fluoreszenzveränderung direkt zur Analyse benutzt wird und aus dem Fluoreszenzsignal auf einen Methylierungszustand geschlossen wird. Eine besonders bevorzugte Variante ist dabei das „Taqman“-Verfahren. In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform wird ein zusätzliches fluoreszenzmarkiertes Oligomer verwendet, das in unmittelbarer Nähe zu dem ersten Reporteroligonukleotid hybridisiert und sich diese Hybridisierung mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer nachweisen läßt („Lightcycler“-Verfahren).

30

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist es, mehrere Fragmente gleichzeitig mittels einer Multiplex-

PCR zu amplifizieren. Bei deren Design muss darauf geachtet werden, daß nicht nur die Primer, sondern auch die weiteren eingesetzten Oligonukleotide nicht zueinander komplementär sein dürfen, so daß eine hochgradige Multiplexierung in diesem Fall schwieriger ist als in üblich. Jedoch hat man bei der chemisch vorbehandelten DNA den Vorteil, daß aufgrund des unterschiedlichen G- und C-Gehaltes der beiden DNA-Stränge ein Forward-Primer niemals auch als Reverse-Primer fungieren kann, was die Multiplexierung wiederum erleichtert und den oben beschriebenen Nachteil im wesentlichen ausgleicht. Die Detektion der Amplifikate ist wiederum über unterschiedliche Verfahren möglich. Denkbar ist dabei etwa die Verwendung von Real-Time-Varianten. Für Amplifikationen von mehr als vier Genen empfiehlt es sich aber, die Amplifikate auf andere Weise zu detektieren. Bevorzugt ist dabei eine Analyse über Arrays (s.o.).

Eine aktuelle Übersicht über weitere mögliche Methoden zur Methylierungsanalyse findet sich in: Fraga and Esteller 2002,a.a.o.).

In den unterschiedlichen Methoden zur Methylierungsanalyse kann die MDA-DNA auf unterschiedliche Weise als Standard eingesetzt werden. Unter Standard ist dabei zum einen jegliche Art der Negativkontrolle oder Positivkontrolle im Falle des Nachweises von nicht-methylierter DNA zu verstehen. Dies ist insbesondere bei Technologien der Fall, die kleinste Mengen methylierte DNA in einem großen Hintergrund von nicht-methylierter DNA nachweisen und umgekehrt (sensitive detection). Hier dient MDA-DNA während der Assay-Entwicklung als Kontrolle der Spezifität des Assays für methylierte DNA und in der Anwendung des As-

says als Negativkontrolle. Erfindungsgemäß bevorzugt ist aber auch, ein Gemisch aus nicht-methylierter DNA und methylierter DNA zu verwenden. Besonders bevorzugt ist es, unterschiedliche Gemische aus nicht-methylierter und methylierter DNA zu verwenden. Hiermit können dann Kalibrierungskurven erstellt werden. Um methylierte DNA zu synthetisieren, wird dabei bevorzugt ebenfalls eine über MDA hergestellte DNA benutzt. Die DNA wird dann mittels einer Sss1-Methylase methyliert (s.o.). Dabei wird die nicht-methylierte DNA ebenfalls mit allen Reaktionskomponenten des Methylierungsansatzes bis auf die Methylase umgesetzt. So ist sichergestellt, dass die DNA-Konzentration in beiden Ansätzen identisch ist, und in beiden Ansätzen die gleichen Reaktionskomponenten anwesend sind. Anschließend werden nicht-methylierte und methylierte DNA in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt, etwa im Verhältnis 4:0 für 0%, 3:1 für 25%, 2:2 für 50%, 1:3 für 75%, 0:4 für 100%. Für die Entwicklung von Assays für die sensitive Detektion kann es bevorzugt sein, Mischungen mit sehr geringen Konzentrationen an methylierter DNA (etwa 1: 2000-1:10000) herzustellen.

Indem der Quotient der Signale, die für den methylierten Zustand detektiert werden, und der Signale, die für den unmethylierten Zustand detektiert werden, gebildet wird, erhält man die gemessene Methylierungsrate. Trägt man diese gegen die theoretischen Methylierungsraten (entsprechend dem Anteil methylierter DNA in den definierten Mischungen) auf und ermittelt die Regression, die durch die Messpunkte geht, erhält man eine Kalibrierungskurve. Anhand dieser Kalibrierungskurve lässt sich über die gemessene Methylierungsrate der Methylierungsgrad der unbekannten Proben bestimmen.

Die oben beschriebenen Kontrollen oder Standards lassen sich bei allen Methoden der quantitativen Methylierungsanalyse verwenden: u.a. bei MS-SnuPE, bei Hybridisierung auf Microarrays, Hybridisierungsassays in Lösung, direkte Bisulfit-Sequenzierung, bei Real Time PCR (z.B. Heavy Methyl, MSP. vgl. zu den PMR-Werten: Eads et al., CANCER RESEARCH 61, 3410-3418, April 15, 2001),

Eine besonders bevorzugte Verwendung der durch WGA-Verfahren hergestellten DNA und des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt in der Diagnose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten. Hierzu gehören u.a. CNS-Fehlfunktionen, Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich außerdem zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen und zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

Erfindungsgemäß ist weiterhin ein Kit, der aus Reagenzien zur Durchführung eines WGA-Verfahrens oder aus bereits über ein WGA-Verfahren amplifizierter DNA sowie aus Reagenzien zur Durchführung einer Bisulfitumwandlung besteht, und optional auch eine Polymerase, Primer und/oder Sonden für eine Amplifikation und Detektion enthält.

Erfindungsgemäß ist auch vollständig methylierte DNA, die über ein WGA-Verfahren hergestellt und anschließend mittels eines Enzyms, bevorzugt der Sss1 Methylase, methyliert wurde. Erfindungsgemäß ist schließlich auch ein Gemisch aus methylierter und nicht-methylierter, über ein genomweites Amplifikationsverfahren hergestellter DNA. Ein solches Gemisch kann insbesondere als Standard in der Methylierungsanalyse verwendet werden. Die Herstellung des Gemisches kann dabei wie oben beschrieben erfolgen. Bevorzugt sind Gemische mit einem Anteil von 5 bis 95% methylierter DNA, besonders bevorzugt Gemische mit einem Anteil methylierter DNA von 10 bis 80%, ganz besonders bevorzugt Gemische mit einem Anteil methylierter DNA von 25 bis 75%.

#### Beispiele

##### Verwendung von MDA-DNA für Kalibrierungen

Der Methylierungsgrad einer DNA aus abdominalem Fettgewebe soll mittels Oligonukleotid-Arrays und zum Vergleich mittels des Ms-SnuPE-Verfahrens bestimmt werden. Hierzu wird die DNA aus der biologischen Probe mit Hilfe des QIAamp Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert. Zur Aufnahme einer Kalibrierungskurve werden unterschiedliche Mischungen methylierter und nicht-methylierter DNA hergestellt (0%, 25%, 50%; 75%, 100%). Die nicht-methylierte DNA wurde

über Molecular Staging bezogen, wo sie über eine MDA-Reaktion aus humaner genomischer DNA aus ganzem Blut hergestellt worden war. Bei einer MDA-Reaktion werden alle Methylierungssignale gelöscht (s.o.). Die

5 vollständig methylierte DNA wird aus der MDA-DNA mittels einer Sss1-Methylase (New England Biolabs) hergestellt. Die Synthese erfolgt nach Herstellerangaben. Die nicht-methylierte DNA wird dabei mit allen Reagenzien bis auf die Sss1-Methylase umgesetzt. So ist sichergestellt, dass

10 die DNA-Konzentration in beiden Ansätzen identisch ist, und in beiden Ansätzen die gleichen Reaktionskomponenten anwesend sind. Anschließend werden die nicht-methylierte und methylierte DNA in folgenden Verhältnissen gemischt: 4:0 für 0%, 3:1 für 25%, 2:2 für 50%, 1:3 für 75%, 0:4

15 für 100%. Die DNA wird anschließend in Gegenwart von Dioxan als denaturierendem Lösemittel Bisulfit-umgewandelt (vgl.: DE 10029 915 A1; deutsche Anmeldung: AZ: 10347396.3). Anschließend werden die DNA-Gemische und die biologische DNA-Probe in einer Multiplex-PCR eingesetzt.

20 Dabei werden jeweils 8 Fragmente amplifiziert. Als Primer werden die in Tabelle 1 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Die Amplifikationen werden mittels des QIAGEN HotStarTaq-Kits im wesentlichen nach Herstellerangaben und mit dem folgenden Temperaturprofil durchgeführt:

25 95°C: 15 min; 45 mal: (95°C: 15sec; 55°C: 30sec; 72°C: 60 sec); 72°C : 10 min. Die Multiplex-PCR-Produkte werden anschließend an ein Oligomer-Array hybridisiert. Die Sonden-Oligonukleotide sind in Tabelle 2 angegeben. Die Hybridisierung und die Signalberechnung erfolgen dabei

30 wie bei Adorjan et al., 2002 (a.a.o.) beschrieben. Für jede Probe und jeden Kalibrierungsmix werden acht Hybridisierungen durchgeführt. Für die Erstellung von

Kalibrierungskurven für eine CpG-Position wird die gemessene Methylierungsrate gegen die theoretische Methylierungsrate aufgetragen. Die gemessene Methylierungsrate ergibt sich aus der Signalintensität einer Oligonukleotidsonde, die für den methylierten Status spezifisch ist, dividiert durch die Gesamtintensität dieser Sonde + einer dazu passenden (also die gleiche CpG-Position abdeckenden) Sonde, die spezifisch ist für den nicht-methylierten Status. Der theoretische Methylierungsstatus entspricht den Methylierungsniveaus der verwendeten definierten Mischungen. Oligonukleotidsonden-Paare, die für Kalibrierungszwecke geeignet sind, weisen monoton steigende Kalibrierungskurven auf. Für die Ms-SnuPE-Reaktion werden die Proben mit den oben aufgeführten Primern in einzelnen PCR-Reaktionen amplifiziert. Die Reaktionsbedingungen sind die gleichen wie für die Multiplex-PCR (s.o.). In der Extensionsreaktion werden als Primer-Bindungsstellen Positionen verwendet, die direkt flankierend zu CpG-Positionen liegen, die denen der Oligonukleotid-Mikroarrays entsprechen. Der Ms-SnuPE-Assay wird entsprechend den Herstellerangaben des MegaBace-SNuPE-Kits durchgeführt. Für die beiden möglichen Varianten des einzubauenden Nucleotides werden mit unterschiedlichen Farbstoffen markierte ddNTPs verwendet. Für jeden SnuPE-Assay werden vier Messungen parallel durchgeführt. Die von der SNP-Profile-Software (Amersham) ermittelten Signalintensitäten der beiden verwendeten Farbstoffe werden entsprechend der oben für den Chip angegebenen Gleichung  $(Imeth+ / (Imeth- + Imeth+))$  verwendet, um die gemessene Methylierungsrate zu ermitteln. Durch das Auftragen dieser Werte gegen die



theoretische Methylierungsrate erhält man wiederum eine Kalibrierungskurve, die monoton steigend sein sollte. Die so erzeugten monoton steigenden Kalibrierungskurven werden verwendet, um aus der gemessenen Methylierungsrate von Proben-DNA die tatsächliche Methylierung zu ermitteln. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 dargestellt. Die y-Achse zeigt den Prozentsatz an Methylierung, die x-Achse die Hybridisierung an verschiedene Oligonukleotide bzw. verschiedene SNUPE-Assays. Die mit den beiden Methoden ermittelten und an entsprechenden Kalibrierungskurven korrigierten Methylierungsraten in Proben-DNA stimmt für die gezeigten CpG-Positionen gut überein. Diese Daten zeigen, dass die über MDA-hergestellte nicht-methylierte DNA bzw. entsprechende Gemische mit methylierter DNA sehr gut als Standard in der Methylierungsanalyse verwendet werden kann.

Tabelle 1: Primer für die Multiplex-Amplifikation

Gen Name	RefSeq-ID	Primer Orientierung	Sequenz
ERS1	NM_000125 & NM_002920	forward	AGGAGGGGGAATTAAATAGA
		reverse	ACAATAAAACCATCCCAAATAC
AR	NM_000044	forward	GTAGTAGTAGTAGTAAGAGA
		reverse	ACCCCTAAATAATTATCCT
CDKN2a	NM_000077	forward	GGGGTTGGTTGGTTATTAGA
		reverse	AACCCTCTACCCACCTAAAT
CDKN2B	NM_004936	forward	GGTTGGTTGAAGGAATAGAAAT
		reverse	CCCACTAAACATACCCTTATTC
GSTP1	NM_000852	forward	ATTTGGGAAAGAGGGAAAG
		reverse	TAAAAACTCTAAACCCCATCC
TP73	NM_005427	forward	AGTAAATAGTGGGTGAGTTATGAA

		reverse	GAAAAACCTCTAAAAACTACTCTC C
MLH1	NM_000249	forward	TAAGGGGAGAGGAGGAGTTT
		reverse	ACCAATTCTCAATCATCTCTTT
MGMT	NM_002412	forward	AAGGTTTTAGGGAAGAGTGTTT
		reverse	ACCTTTTCCTATCACAAAAATAA

Tabelle 2: Oligonukleotidsonden

Name des Oligonukleotids	Sequenz
Oligonukleotidsonden für ERS1	
41:204A209	ATTTAGTAGCGACGATAAGT
41:204A204	GTAGCGACGATAAGTAAAGT
41:204A217	TTAGTAGCGACGATAAGTAAA
41:204A2212	TTTATTTAGTAGCGACGATAAG
41:204B237	TTAGTAGTGATGATAAGTAAAGT
41:204B2413	TTTTATTTAGTAGTGATGATAAGT
41:204B2512	TTTATTTAGTAGTGATGATAAGTAA
41:204B2511	TTATTTAGTAGTGATGATAAGTAAA
41:248A195	GGGATCGTTTTAAATCGAG
41:248A204	GGATCGTTTTAAATCGAGTT
41:248A206	TGGGATCGTTTTAAATCGAG
41:248A213	GATCGTTTTAAATCGAGTTGT
41:248B216	TGGGATTGTTTTAAATTGAGT
41:248B223	GATTGTTTTAAATTGAGTTGTG
41:248B224	GGATTGTTTTAAATTGAGTTGT
41:248B228	TTTGGGATTGTTTTAAATTGAG
41:607A183	GTTTCGCGGTACGGATTA
41:607A193	GTTTCGCGGTACGGATTAT
41:607A194	TGTTTCGCGGTACGGATTA

Name des Oligonukleotids	Sequenz
41:608A203	GTTTCGCGGTTACGGATTATG
41:607B213	GTTTGTGGTTATGGATTATGA
41:607B219	TATTTTGTGTGTGGTTATGGA
41:607B215	TTGTTTGTGGTTATGGATTAT
41:607B227	TTTTGTTTGTGGTTATGGATTA
41:451A193	TATCGGATTCGTAGGTTTT
41:451A204	TTATCGGATTCGTAGGTTTT
41:451A206	TTTTATCGGATTCGTAGGTT
41:451A207	GTTTTATCGGATTCGTAGGT
41:451B218	GGTTTTATTGGATTTGTAGGT
41:451B226	TTTTATTGGATTTGTAGGTTTT
41:451B227	GTTTTATTGGATTTGTAGGTTT
41:451B237	GTTTTATTGGATTTGTAGGTTTT
Oligonukleotidsonden für AR	
87:971A188	AGTATTTTTCGGACGAGGA
87:971A183	TTTCGGACGAGGATGATT
87:971A196	TATTTTTCGGACGAGGATGA
87:971A1910	TTAGTATTTTTCGGACGAGG
87:971B218	AGTATTTTTCGGATGAGGATGA
87:971B2112	TGTTAGTATTTTTCGGATGAGG
87:971B213	TTTTGGATGAGGATGATTAG
87:971B217	GTATTTTTCGGATGAGGATGAT
87:1137°164	GTAGCGGGAGAGCGAG
87:1137°175	AGTAGCGGGAGAGCGAG
87:1137°186	TAGTAGCGGGAGAGCGAG
87:1137B183	TAGTGGGAGAGTGAGGGA
87:1137B185	AGTAGTGGGAGAGTGAGG
87:1137B197	GTAGTAGTGGGAGAGTGAG
87:1137B174	GTAGTGGGAGAGTGAGG

Name Oligonukleotids	des Sequenz
87:869A195	ATAGTCGTAGTCGGTTTTCG
87:869A208	TTTATAGTCGTAGTCGGTTT
87:869A219	TTTTATAGTCGTAGTCGGTTT
87:869A2111	ATTTTTATAGTCGTAGTCGGT
87:869B193	AGTTGTAGTTGGTTTTGGA
87:869B2212	AATTTTTATAGTTGTAGTTGGT
87:869B2313	TAATTTTTATAGTTGTAGTTGGT
87:869B2414	GTAATTTTTATAGTTGTAGTTGGT
87:814A228	AAGTTTATCGTAGAGGTTTTAT
87:814A2212	TTTAAAGTTTATCGTAGAGGTT
87:814A2310	TTAAGTTTATCGTAGAGGTTTA
87:814A238	AAGTTTATCGTAGAGGTTTTATA
87:814B228	AAGTTTATTGTAGAGGTTTTAT
87:814B2210	TTAAGTTTATTGTAGAGGTTTT
87:814B2212	TTTAAAGTTTATTGTAGAGGTT
87:814B2211	TTTAAAGTTTATTGTAGAGGTTT
Oligonukleotidsonden für CDKN2A	
2035:2147A173	GGGCGTTGTTTAACGTA
2035:2147A183	GGGCGTTGTTTAACGTAT
2035:2147B195	GGGGGTGTTGTTTAATGTA
2035:2147B194	GGGGTGTTGTTTAATGTAT
2035:2157A217	TGTTTAACGTATCGAATAGTT
2035:2157A227	TGTTTAACGTATCGAATAGTTA
2035:2157A228	TTGTTTAACGTATCGAATAGTT
2035:2157A238	TTGTTTAACGTATCGAATAGTTA
2035:2157B229	GTTGTTTAATGTATTGAATAGT
2035:2157B239	GTTGTTTAATGTATTGAATAGTT
2035:2157B249	GTTGTTTAATGTATTGAATAGTTA
2035:2183A176	GGAGGTCGATTTAGGTC

Name des Oligonukleotids	Sequenz
2035:2183A186	GGAGGTCGATTTAGGTGG
2035:2183B186	GGAGGTTGATTTAGGTGG
2035:2172A183	TTACGGTCGGAGGTCGAT
2035:2172A165	AGTTACGGTCGGAGGT
2035:2172A176	TAGTTACGGTCGGAGGT
2035:2172A188	AATAGTTACGGTCGGAGG
2035:2172B198	AATAGTTATGGTTGGAGGT
2035:2172B209	GAATAGTTATGGTTGGAGGT
2035:2172B194	GTTATGGTTGGAGGTTGAT
2035:2172B203	TTATGGTTGGAGGTTGATTT
Oligonukleotidsonden für CDKN2B	
2036:2279A185	GTTTACGGTTAACGGTGG
2036:2279A183	TTACGGTTAACGGTGGAT
2036:2279A197	AAGTTTACGGTTAACGGTG
2036:2279A209	TTAAGTTTACGGTTAACGGT
2036:2279B206	AGTTTATGGTTAATGGTGGA
2036:2279B216	AGTTTATGGTTAATGGTGGAT
2036:2279B223	TTATGGTTAATGGTGGATTATT
2036:2279B2210	GTTAAGTTTATGGTTAATGGTG
2036:2330A156	GGAATGCGCGAGGAG
2036:2330A165	GAATGCGCGAGGAGAA
2036:2330A175	GAATGCGCGAGGAGAAT
2036:2330A184	AATGCGCGAGGAGAATAA
2036:2330B186	GGAATGTGTGAGGAGAAT
2036:2330B196	GGAATGTGTGAGGAGAATA
2036:2330B205	GAATGTGTGAGGAGAATAAG
2036:2329B206	GGAATGTGTGAGGAGAATAA
2036:2234A168	AGAGAGTGCGTCGGAG
2036:2234A167	GAGAGTGCGTCGGAGT

Name des Oligonukleotids	Sequenz
2036:2234A166	AGAGTGCCTCGGAGTA
2036:2234A176	AGAGTGCCTCGGAGTAG
2036:2234B178	AGAGAGTGTGTTGGAGT
2036:2234B188	AGAGAGTGTGTTGGAGTA
2036:2234B187	GAGAGTGTGTTGGAGTAG
2036:2234B198	AGAGAGTGTGTTGGAGTAG
2036:2268A193	TGTCGTTAAGTTTACGGTT
2036:2268A194	GTGTCGTTAAGTTTACGGT
2036:2268A205	AGTGTCTGTTAAGTTTACGGT
2036:2268A203	TGTCGTTAAGTTTACGGTTA
2036:2268B215	AGTGTGTTAAGTTTATGGTT
2036:2268B216	GAGTGTGTTAAGTTTATGGT
2036:2268B224	GTGTTGTTAAGTTTATGGTTAA
2036:2268B225	AGTGTGTTAAGTTTATGGTTA
Oligonukleotidsonden für MGMT	
2153:597A188	GGATTATTCGGGTACGTG
2153:597A184	TATTCGGGTACGTGGTAG
2153:597A186	ATTATTCGGGTACGTGGT
2153:597A196	ATTATTCGGGTACGTGGTA
2153:597B193	ATTTGGGTATGTGGTAGGT
2153:597B205	TTATTTGGGTATGTGGTAGG
2153:597B204	TATTTGGGTATGTGGTAGGT
2153:597B2212	TTAGGATTATTTGGGTATGTG
2153:621A174	TGTACGTTCCGCGGATTA
2153:621A183	GTACGTTCCGCGGATTATT
2153:621A185	TTGTACGTTCCGCGGATTA
2153:621A184	TGTACGTTCCGCGGATTAT
2153:621B217	GTTTGTATGTTTGTGGATTAT
2153:621B224	TGTATGTTTGTGGATTATTTTT

Name des Oligonukleotids	Sequenz
2153:621B223	GTATGTTTGTGGATTATTTTG
2153:621B225	TTGTATGTTTGTGGATTATTTT
2153:394A197	TTTTGGACGGTATCGTTTA
2153:394A206	TTTGGACGGTATCGTTTATT
2153:394A208	TTTTTGGACGGTATCGTTTA
2153:394A213	GGACGGTATCGTTTATTATAG
2153:394B2111	TAGTTTTTGGATGGTATTGTT
2153:394B229	GTTTTTGGATGGTATTGTTTAT
2153:394B234	TGGATGGTATTGTTTATTATAGG
2153:394B237	TTTTGGATGGTATTGTTTATTAT
2153:530A173	TTTCGAGTAGGATCGGG
2153:530A184	GTTTCGAGTAGGATCGGG
2153:530A183	TTTCGAGTAGGATCGGGA
2153:530A193	TTTCGAGTAGGATCGGGAT
2153:530B194	GTTTTGAGTAGGATTGGGA
2153:530B193	TTTTGAGTAGGATTGGGAT
2153:530B203	TTTTGAGTAGGATTGGGATT
2153:530B204	GTTTTGAGTAGGATTGGGAT
Oligonukleotidsonden für MLH1	
2157:1753A176	GAAGAGCGGATAGCGAT
2157:1753A185	AAGAGCGGATAGCGATTT
2157:1753A184	AGAGCGGATAGCGATTTT
2157:1753A193	GAGCGGATAGCGATTTTTA
2157:1753B198	AGGAAGAGTGGATAGTGAT
2157:1753B2110	ATAGGAAGAGTGGATAGTGAT
2157:1753B214	AGAGTGGATAGTGATTTTTAA
2157:1753B226	GAAGAGTGGATAGTGATTTTA
2157:2026A186	AAATGTCGTTTCGTGGTAG
2157:2026A197	AAAATGTCGTTTCGTGGTAG

Name des Oligonukleotids	Sequenz
2157:2026A1910	GTTAAAATGTCGTTTCGTGG
2157:2026A209	TTAAAATGTCGTTTCGTGGTA
2157:2026B195	AATGTTGTTTGTGGTAGGG
2157:2026B207	AAAATGTTGTTTGTGGTAGG
2157:2026B218	TAAAATGTTGTTTGTGGTAGG
2157:2026B2110	GTTAAAATGTTGTTTGTGGTA
2157:1770A186	TTTAAACGCGTAAGCGTA
2157:1770A194	TTAACGCGTAAGCGTATAT
2157:1770A195	TTTAAACGCGTAAGCGTATA
2157:1770A203	TAACGCGTAAGCGTATATTT
2157:1770B239	GATTTTTAATGTGTAAGTGTATA
2157:1770B234	TTAATGTGTAAGTGTATATTTTT
2157:1770B249	GATTTTTAATGTGTAAGTGTATAT
2157:1770B259	GATTTTTAATGTGTAAGTGTATATT
2157:1939A173	GAACGTGAGTACGAGGT
2157:1939A183	GAACGTGAGTACGAGGTA
2157:1939A185	AAGAACGTGAGTACGAGG
2157:1939A186	GAAGAACGTGAGTACGAG
2157:1939B207	GGAAGAATGTGAGTATGAGG
2157:1939B208	AGGAAGAATGTGAGTATGAG
2157:1939B216	GAAGAATGTGAGTATGAGGTA
2157:1939B213	GAATGTGAGTATGAGGTATTG
Oligonukleotidsonden für TP73	
2322:750A174	GATTCGTTGCGGTTAGA
2322:750A184	GATTCGTTGCGGTTAGAG
2322:750A183	ATTCGTTGCGGTTAGAGA
2322:750A185	GGATTCGTTGCGGTTAGA
2322:750B205	GGATTTGTTGTGGTTAGAGA
2322:750B213	ATTTGTTGTGGTTAGAGAATT



Name des Oligonukleotids	Sequenz
2322:750B214	GATTTGTTGTGGTTAGAGAAT
2322:750B223	ATTTGTTGTGGTTAGAGAATTT
2322:1082A164	GGTGCGCGTAGAGAAT
2322:1082A166	TTGGTGCGCGTAGAGA
2322:1082A165	TGGTGCGCGTAGAGAA
2322:1082A174	GGTGCGCGTAGAGAATA
2322:1082B1810	AGGTTTCGTGTGTGTAGA
2322:1082B195	TGGTGTGTGTAGAGAATAA
2322:1082B207	TTTGGTGTGTGTAGAGAATA
2322:1082B217	TTTGGTGTGTGTAGAGAATAA
2322:858A186	GGATATCGGTTCCGAGTT
2322:858A189	AGAGGATATCGGTTCCGA
2322:858A195	GATATCGGTTCCGAGTTAG
2322:858A193	TATCGGTTCCGAGTTAGAT
2322:858B2011	GTAGAGGATATTGGTTTGGA
2322:858B208	GAGGATATTGGTTTGAGTT
2322:858B224	ATATTGGTTTGAGTTAGATTA
2322:858B235	GATATTGGTTTGAGTTAGATTA
2322:1135A204	ATATCGAACGGGATTTAGAG
2322:1135A2112	TTTTTTAAATATCGAACGGGA
2322:1135A228	TTAAATATCGAACGGGATTTAG
2322:1135A229	TTTAAATATCGAACGGGATTTA
2322:1135B224	ATATTGAATGGGATTTAGAGTT
2322:1135B237	TAAATATTGAATGGGATTTAGAG
2322:1135B248	TTAAATATTGAATGGGATTTAGAG
2322:1135B2413	TTTTTTTAAATATTGAATGGGATT
Oligonukleotidsonden für GSTP1	
2111:1900A157	GGGAGTTCGCGGGAT
2111:1900A166	GGAGTTCGCGGGATTT

Name des Oligonukleotids	Sequenz
2111:1900A175	GAGTTCGCGGGATTTTT
2111:1900A185	GAGTTCGCGGGATTTTT
2111:1900B177	GGGAGTTTGTGGGATTT
2111:1900B187	GGGAGTTTGTGGGATTTT
2111:1900B196	GGAGTTTGTGGGATTTTTT
2111:1900B206	GGAGTTTGTGGGATTTTTTA
2111:2007A196	GAGTTTCGTCGTCGTAGTT
2111:2007B198	TGGAGTTTGTGTGTAG
2111:2007B219	TTGGAGTTTGTGTGTAGT
2111:2126A207	GGTTTTTCGTTTATTTTCGAG
2111:2126A216	GTTTTTCGTTTATTTTCGAGAT
2111:2126A218	AGGTTTTTCGTTTATTTTCGAG
2111:2126A226	GTTTTTCGTTTATTTTCGAGATT
2111:2126B217	GGTTTTTGTTTATTTTGAGA
2111:2126B227	GGTTTTTGTTTATTTTGAGAT
2111:2126B228	AGGTTTTTGTTTATTTTGAGA
2111:2126B2310	GTAGGTTTTTGTTTATTTTGAG
2111:2142A153	ATTCGGGACGGGGGT
2111:2142A154	GATTCGGGACGGGGG
2111:2142A155	AGATTCGGGACGGGG
2111:2142A156	GAGATTCGGGACGGG
2111:2142B174	GATTTGGGATGGGGGTT
2111:2142B175	AGATTTGGGATGGGGGT
2111:2142B176	GAGATTTGGGATGGGGG
2111:2142B184	GATTTGGGATGGGGGTTT
Oligonukleotidsonden für CDH13 C	
2383:137A1810	ATGTTATTTTCGCGGGGT
2383:137B1910	ATGTTATTTTGTGGGGTT
2383:137B2011	GATGTTATTTTGTGGGGTT

Name des Oligonukleotids	Sequenz
2383:153A174	TTTTTCGCGAGGTGTTTA
2383:153A184	TTTTTCGCGAGGTGTTTAT
2383:153A185	TTTTTCGCGAGGTGTTTA
2383:153A195	TTTTTCGCGAGGTGTTTAT
2383:153B206	GTTTTTTGTGAGGTGTTTAT
2383:153B215	TTTTTTGTGAGGTGTTTATTT
2383:153B216	GTTTTTTGTGAGGTGTTTATT
2383:153B226	GTTTTTTGTGAGGTGTTTATTT
2383:187A173	AAACGAGGGAGCGTTAG
2383:187A174	AAAACGAGGGAGCGTTA
2383:187A175	TAAAACGAGGGAGCGTT
2383:187A185	TAAAACGAGGGAGCGTTA
2383:187B183	AAATGAGGGAGTGTTAGG
2383:187B193	AAATGAGGGAGTGTTAGGA
2383:187B194	AAAATGAGGGAGTGTTAGG
2383:187B197	TGTAAAATGAGGGAGTGTT
2383:22°203	GGTCGTTAGTTTTTCGTGTA
2383:22B203	GGTTGTTAGTTTTTTGTGTA
2383:22B213	GGTTGTTAGTTTTTTGTGTAA
2383:22B214	TGGTTGTTAGTTTTTTGTGTA
2383:22B223	GGTTGTTAGTTTTTTGTGTAAT

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Methylierungsanalyse, dadurch gekennzeichnet, dass

- c) eine genomweite Amplifikation durchgeführt wird,
- d) die Amplifikate als Standard in der Methylierungsanalyse verwendet werden

2. Verwendung von durch genomweite Amplifizierungsverfahren hergestellter DNA als Standard in der Methylierungsanalyse.

3. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Amplifikationsverfahren PEP, DOP-PCR oder Linker-PCR durchgeführt werden.

4. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Amplifikationsverfahren eine Multiple Displacement Amplification" (MDA) durchgeführt wird.

5. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass in der MDA eine  $\phi$ 29-Polymerase eingesetzt wird.

6. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die MDA mittels eines kommerziell erhältlichen Kits erfolgt.

7. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Kit „GenomiPhi“ (Amersham Biosciences) oder „Repli-g“ (Molecular Staging) verwendet wird.

8. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, das als Standard kommerziell erhältliche, über MDA hergestellte DNA verwendet wird.

5 9. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse über Restriktionsenzyme erfolgt.

10 10. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse über methylierungsspezifische Ligationsverfahren, MSP, Heavy Methyl oder Methyl-Light erfolgt.

15 11. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse über Primer-Extension erfolgt.

20 12. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse über eine Amplifikation und eine Hybridisierung der Amplifikate an Oligomer-Arrays erfolgt.

25 13. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse mittels einer Multiplex-PCR erfolgt.

30 14. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-13, dadurch gekennzeichnet, dass als Standard eine Mischung aus methylierter und nicht-methylierter DNA verwendet wird.

35 15. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-14, dadurch gekennzeichnet, dass als Standard mehrere Gemische aus methylierter und nicht-methylierter DNA mit unterschiedlichen Anteilen an methylierter und nicht-methylierter DNA verwendet werden.

16. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-15, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse zur Diagnose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten erfolgt.
17. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen und zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben, oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung erfolgt.
18. Ein Kit, der aus Reagenzien zur Durchführung eines WGA-Verfahrens oder aus bereits über ein WGA-Verfahren amplifizierter DNA sowie aus Reagenzien zur Durchführung einer Bisulfitumwandlung besteht, und optional auch eine Polymerase, Primer und/oder Sonden für eine Amplifikation und Detektion enthält
19. Methylierte DNA, die über ein WGA-Verfahren hergestellt und anschließend mittels eines Enzyms methyliert wurde.
20. Methylierte DNA die über ein WGA-Verfahren hergestellt und anschließend mittels der Sss1 Methylase methyliert wurde.
21. Gemisch aus methylierter und nicht-methylierter, über ein genomweites Amplifikationsverfahren hergestellter DNA.
22. Gemisch aus methylierter und nicht-methylierter, über ein genomweites Amplifikationsverfahren hergestellter

DNA, bei dem der Anteil der methylierten DNA zwischen 5 und 95 % liegt.

5 23. Gemisch aus methylierter und nicht-methylierter, über ein genomweites Amplifikationsverfahren hergestellter DNA, bei dem der Anteil der methylierten DNA zwischen 10 und 80 % liegt.

10 24. Gemisch aus methylierter und nicht-methylierter, über ein genomweites Amplifikationsverfahren hergestellter DNA, bei dem der Anteil der methylierten DNA zwischen 25 und 75 % liegt.

15 25. Verwendung der DNA nach den Ansprüchen 19 bis 20 oder eines Gemisches nach einem der Ansprüche 21 bis 24 zur Methylierungsanalyse.

### Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von DNA, in der 5-Methylcytosin nicht auftritt. Solche nicht-methylierte DNA ist insbesondere als Kontrolle für eine verlässliche und sensitive Analyse von Cytosinmethylierungen erforderlich. Die nicht-methylierte DNA wird dabei über genomweite Amplifikationsverfahren, insbesondere über eine „Multiple Displacement Amplification“ (MDA) synthetisiert. Die nicht-methylierte DNA läßt sich als Standard in einer Vielzahl von Methoden zur Methylierungsanalyse einsetzen.





## Sequence listing

&lt;110&gt; Epigenomics AG

&lt;120&gt; Method for making of non methylated DNA

&lt;160&gt; 280

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

&lt;400&gt; 1

aggaggggga attaaataga

20

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

&lt;400&gt; 2

acaataaaac catcccaa ac

22

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

&lt;400&gt; 3

gtagtagtag tagtaagaga

20

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

&lt;400&gt; 4

acccctaaa taattatcct

20

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 5

gggggttggtt ggttattaga

20

<210> 6  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 6

aaccctctac ccacctaaat

20

<210> 7  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 7

ggttggttga aggaatagaa at

22

<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 8

atttagtagc gacgataagt

20

<210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 9

gtagcgacga taagtaaagt

20

<210> 10  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 10  
 ttagtagcga cgataagtaa a 21  
 <210> 11  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 11  
 tttatttagt agcgacgata ag 22  
 <210> 12  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 12  
 ttagtagtga tgataagtaa agt 23  
 <210> 13  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 13  
 ttttatttag tagtgatgat aagt 24  
 <210> 14  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 14  
 tttatttagt agtgatgata agtaa 25  
 <210> 15  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 15  
 ttatttagta gtgatgataa gtaaa 25

<210> 16  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 16  
  
 gggatcgttt taaatcgag 19  
  
 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 17  
  
 ggatcgtttt aaatcgagtt 20  
  
 <210> 18  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 18  
  
 tgggatcggtt ttaaactgag 20  
  
 <210> 19  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 19  
  
 gatcgtttta aatcgagttg t 21  
  
 <210> 20  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 20  
  
 tgggattggtt ttaaattgag t 21  
  
 <210> 21  
 <211> 22

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 21  
  
 gattgtttta aattgagttg tg 22  
  
 <210> 22  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 22  
  
 ggattgtttt aaattgagtt gt 22  
  
 <210> 23  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 23  
  
 tttgggattg ttttaaattg ag 22  
  
 <210> 24  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 24  
  
 gttcgcggtt acggatta 18  
  
 <210> 25  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 25  
  
 gttcgcggtt acggattat 19  
  
 <210> 26  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 26  
 tgttcgcggt tacggatta 19  
 <210> 27  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 27  
 gttcgcggtt acggattatg 20  
 <210> 28  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 28  
 gtttgtggtt atggattatg a 21  
 <210> 29  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 29  
 tattttgttt gtggttatgg a 21  
 <210> 30  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 30  
 ttgtttgtgg ttatggatta t 21  
 <210> 31  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 31  
 ttttgtttgt ggttatggat ta 22  
 <210> 32  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 32  
 tatcggattc gtaggtttt 19  
 <210> 33  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 33  
 ttatcggatt cgtaggtttt 20  
 <210> 34  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 34  
 ttttatcgga ttcgtaggtt 20  
 <210> 35  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 35  
 gttttatcgg attcgtaggt 20  
 <210> 36  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 36  
 ggttttattg gatttgtagg t 21



<210> 37  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 37  
  
 tttttattgga tttgtaggtt tt 22  
  
 <210> 38  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 38  
  
 gtttttattgg atttgtaggt tt 22  
  
 <210> 39  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 39  
  
 gtttttattgg atttgtaggt ttt 23  
  
 <210> 40  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 40  
  
 agtatttttcg gacgagga 18  
  
 <210> 41  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 41  
  
 ttttcggacga ggatgatt 18  
  
 <210> 42  
 <211> 19

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 42  
  
 tatttttcgga cgaggatga 19  
  
 <210> 43  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 43  
  
 ttagtattttt cggacgagg 19  
  
 <210> 44  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 44  
  
 agtattttttg gatgaggatg a 21  
  
 <210> 45  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 45  
  
 tgtagtatt tttggatgag g 21  
  
 <210> 46  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 46  
  
 ttttggatga ggatgattta g 21  
  
 <210> 47  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 47  
 gtatttttgg atgaggatga t 21  
 <210> 48  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 48  
 gtagcgggag agcgag 16  
 <210> 49  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 49  
 agtagcggga gagcgag 17  
 <210> 50  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 50  
 tagtagcggg agagcgag 18  
 <210> 51  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 51  
 tagtgggaga gtgagga 18  
 <210> 52  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 52  
 agtagtggga gagtgagg 18  
 <210> 53  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 53  
 gtagtagtgg gagagtgag 19  
 <210> 54  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 54  
 gtagtgggag agtgagg 17  
 <210> 55  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 55  
 atagtcgtag tcggttttg 19  
 <210> 56  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 56  
 tttatagtcg tagtcggttt 20  
 <210> 57  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 57  
 ttttatagtc gtagtcggtt t 21

<210> 58  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 58  
  
 atttttatag tcgtagtcgg t 21  
  
 <210> 59  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 59  
  
 agttgtagtt gggtttgga 19  
  
 <210> 60  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 60  
  
 aatttttata gttgtagttg gt 22  
  
 <210> 61  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 61  
  
 taatttttat agttgtagtt ggt 23  
  
 <210> 62  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 62  
  
 gtaattttta tagttgtagt tgggt 24  
  
 <210> 63  
 <211> 22

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 63  
  
 aagtttatcg tagaggtttt at 22  
  
 <210> 64  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 64  
  
 ttttaagttt atcgtagagg tt 22  
  
 <210> 65  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 65  
  
 ttaagtttat cgtagaggtt tta 23  
  
 <210> 66  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 66  
  
 aagtttatcg tagaggtttt ata 23  
  
 <210> 67  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 67  
  
 aagtttattg tagaggtttt at 22  
  
 <210> 68  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 68  
 ttaagtttat tgtagaggtt tt 22  
 <210> 69  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 69  
 ttttaagttt attgtagagg tt 22  
 <210> 70  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 70  
 tttaagttta ttgtagaggt tt 22  
 <210> 71  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 71  
 gggcgttggt taacgta 17  
 <210> 72  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 72  
 gggcgttggt taacgtat 18  
 <210> 73  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 73

gggggtgttg tttaatgta

19

<210> 74

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 74

gggggtgttgt ttaatgtat

19

<210> 75

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 75

tgtttaacgt atcgaatagt t

21

<210> 76

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 76

tgtttaacgt atcgaatagt ta

22

<210> 77

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 77

ttgtttaacg tatcgaatag tt

22

<210> 78

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 78

ttgtttaacg tatcgaatag tta

23



<210> 79  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 79  
  
 gttgtttaat gtattgaata gt 22  
  
 <210> 80  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 80  
  
 gttgtttaat gtattgaata gtt 23  
  
 <210> 81  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 81  
  
 gttgtttaat gtattgaata gtta 24  
  
 <210> 82  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 82  
  
 ggaggtcgat ttaggtg 17  
  
 <210> 83  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 83  
  
 ggaggtcgat ttaggtgg 18  
  
 <210> 84  
 <211> 18

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 84  
  
 ggaggttgat ttaggtgg 18  
  
 <210> 85  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 85  
  
 ttacggtcgg aggtcgat 18  
  
 <210> 86  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 86  
  
 agttacggtc ggaggt 16  
  
 <210> 87  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 87  
  
 tagttacggt cggaggt 17  
  
 <210> 88  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 88  
  
 aatagttacg gtcggagg 18  
  
 <210> 89  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 89  
 aatagttatg gttggaggt 19  
 <210> 90  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 90  
 gaatagttat ggttggaggt 20  
 <210> 91  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 91  
 gttatggttg gaggttgat 19  
 <210> 92  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 92  
 ttatggttgg aggttgattt 20  
 <210> 93  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 93  
 gtttacggtt aacggtgg 18  
 <210> 94  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 94

ttacgggtaa cgggtggat

18

<210> 95

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 95

aagtttacgg ttaacgggtg

19

<210> 96

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 96

ttaagtttac ggttaacggt

20

<210> 97

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 97

agtttatggt taatgggtgga

20

<210> 98

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 98

agtttatggt taatgggtgga t

21

<210> 99

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 99

ttatgggtaa tgggtggatta tt

22

<210> 100  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 100

gttaagttta tggттаатgg tg

22

<210> 101  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 101

ggaatgсgсg aggag

15

<210> 102  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 102

gaatgсgсga ggagaa

16

<210> 103  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 103

gaatgсgсga ggagaat

17

<210> 104  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 104

aatgсgсgag gagaataa

18

<210> 105  
<211> 18

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 105

ggaatgtgtg aggagaat

18

<210> 106  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 106

ggaatgtgtg aggagaata

19

<210> 107  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 107

gaatgtgtga ggagaataag

20

<210> 108  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 108

ggaatgtgtg aggagaataa

20

<210> 109  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 109

agagagtgcg tcggag

16

<210> 110  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 110  
 gagagtgcgt cggagt 16  
 <210> 111  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 111  
 agagtgcgtc ggagta 16  
 <210> 112  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 112  
 agagtgcgtc ggagtag 17  
 <210> 113  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 113  
 agagagtgtg ttggagt 17  
 <210> 114  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 114  
 agagagtgtg ttggagta 18  
 <210> 115  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 115  
 gagagtgtgt tggagtag 18  
 <210> 116  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 116  
 agagagtgtg ttggagtag 19  
 <210> 117  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 117  
 tgtcgttaag tttacggtt 19  
 <210> 118  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 118  
 gtgtcgttaa gtttacggt 19  
 <210> 119  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 119  
 agtgtcgtta agtttacggt 20  
 <210> 120  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 120  
 tgtcgttaag tttacggtta 20



<210> 121  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 121  
  
 agtgttggtta agtttatggt t 21  
  
 <210> 122  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 122  
  
 gagtgttggtt aagtttatgg t 21  
  
 <210> 123  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 123  
  
 gtgttggttaa gtttatggtt aa 22  
  
 <210> 124  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 124  
  
 agtgttggtta agtttatggt ta 22  
  
 <210> 125  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 125  
  
 ggattattcg ggtacgtg 18  
  
 <210> 126  
 <211> 18

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 126

tattcgggta cgtggtag

18

<210> 127  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 127

attattcggg tacgtggt

18

<210> 128  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 128

attattcggg tacgtggt

19

<210> 129  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 129

atttgggtat gtggtaggt

19

<210> 130  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 130

ttatttgggt atgtggtagg

20

<210> 131  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 131  
 tatttgggta tgtggtaggt 20  
 <210> 132  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 132  
 tttaggatta tttgggtatg tg 22  
 <210> 133  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 133  
 tgtacgttcg cggatta 17  
 <210> 134  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 134  
 gtacgttcgc ggattatt 18  
 <210> 135  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 135  
 ttgtacgttc gcggatta 18  
 <210> 136  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 136

tgtacgttcg cggattat

18

<210> 137

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 137

gtttgtatgt ttgtggatta t

21

<210> 138

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 138

tgtatgtttg tggattat tt

22

<210> 139

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 139

gtatgtttgt ggattat tt

22

<210> 140

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 140

ttgtatgttt gtggattatt tt

22

<210> 141

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 141

ttttggacgg tatcg tta

19

<210> 142  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 142  
  
 tttggacggt atcgtttatt 20  
  
 <210> 143  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 143  
  
 tttttggacg gtatcgttta 20  
  
 <210> 144  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 144  
  
 ggacggtatc gtttattata g 21  
  
 <210> 145  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 145  
  
 tagtttttgg atggtattgt t 21  
  
 <210> 146  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 146  
  
 gtttttggat ggtattgttt at 22  
  
 <210> 147  
 <211> 23

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 147  
  
 tggatggtat tgtttattat agg 23  
  
 <210> 148  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 148  
  
 ttttggatgg tattgtttat tat 23  
  
 <210> 149  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 149  
  
 tttcgagtag gatcggg 17  
  
 <210> 150  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 150  
  
 gtttcgagta ggatcggg 18  
  
 <210> 151  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 151  
  
 tttcgagtag gatcggga 18  
  
 <210> 152  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 152

tttcgagtag gatcgggat

19

<210> 153  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 153

gttttgagta ggattggga

19

<210> 154  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 154

ttttgagtag gattgggat

19

<210> 155  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 155

ttttgagtag gattgggatt

20

<210> 156  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 156

gttttgagta ggattgggat

20

<210> 157  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 157

gaagagcggga tagcgat

17

<210> 158

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 158

aagagcgggat agcgattt

18

<210> 159

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 159

agagcgggata gcgatttt

18

<210> 160

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 160

gagcgggatag cgattttta

19

<210> 161

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 161

aggaagagtg gatagtgat

19

<210> 162

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 162

ataggaagag tggatagtga t

21



<210> 163  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 163

agagtggata gtgattttta a

21

<210> 164  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 164

gaagagtgga tagtgatttt ta

22

<210> 165  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 165

aaatgtcgtt cgtggttag

18

<210> 166  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 166

aaaatgtcgt tcgtggttag

19

<210> 167  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 167

gttaaaatgt cgttcgtgg

19

<210> 168  
<211> 20

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 168  
  
 ttaaaatgtc gttcgtggta 20  
  
 <210> 169  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 169  
  
 aatgttgttt gtggtaggg 19  
  
 <210> 170  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 170  
  
 aaaatgttgt ttgtggtagg 20  
  
 <210> 171  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 171  
  
 taaaatgttg tttgtggtag g 21  
  
 <210> 172  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 172  
  
 gttaaaatgt tgtttggtg a 21  
  
 <210> 173  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 173

ttttaacgcg taagcgta

18

<210> 174  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 174

ttaacgcgta agcgtatat

19

<210> 175  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 175

ttttaacgcgt aagcgtata

19

<210> 176  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 176

taacgcgtaa gcgtatatatt

20

<210> 177  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
<400> 177

gattttttaat gtgtaagtgt ata

23

<210> 178  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 178  
 ttaatgtgta agtgatatatt ttt 23  
 <210> 179  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 179  
 gattttttaat gtgtaagtgt atat 24  
 <210> 180  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 180  
 gattttttaat gtgtaagtgt atatt 25  
 <210> 181  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 181  
 gaacgtgagt acgaggt 17  
 <210> 182  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 182  
 gaacgtgagt acgaggta 18  
 <210> 183  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 183  
 aagaacgtga gtacgagg 18

<210> 184  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 184  
 gaagaacgtg agtacgag 18  
  
 <210> 185  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 185  
 ggaagaatgt gagtatgagg 20  
  
 <210> 186  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 186  
 aggaagaatg tgagtatgag 20  
  
 <210> 187  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 187  
 gaagaatgtg agtatgaggt a 21  
  
 <210> 188  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 188  
 gaatgtgagt atgaggtatt g 21  
  
 <210> 189  
 <211> 17

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 189  
  
 gattcgttgc ggttaga 17  
  
 <210> 190  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 190  
  
 gattcgttgc ggtagag 18  
  
 <210> 191  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 191  
  
 attcgttgcg gttagaga 18  
  
 <210> 192  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 192  
  
 ggattcgttg cggttaga 18  
  
 <210> 193  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 193  
  
 ggatttggtg tggtagaga 20  
  
 <210> 194  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 194  
 atttggttggtg gtttagagaat t 21  
 <210> 195  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 195  
 gatttggttggt ggtagagaa t 21  
 <210> 196  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 196  
 atttggttggtg gtttagagaat tt 22  
 <210> 197  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 197  
 ggtgcgcgta gagaat 16  
 <210> 198  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 198  
 ttggtgcgcg tagaga 16  
 <210> 199  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 199

tggtgcgcggt agagaa

16

<210> 200

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 200

ggtgcgcgta gagaata

17

<210> 201

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 201

aggtttggtg tgtgtaga

18

<210> 202

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 202

tggtgtgtgt agagaataa

19

<210> 203

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 203

tttggtgtgt gtagagaata

20

<210> 204

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 204

tttggtgtgt gtagagaata a

21



<210> 205  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 205  
  
 ggatatcggg t cggagtt 18  
  
 <210> 206  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 206  
  
 agaggatatc ggttcgga 18  
  
 <210> 207  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 207  
  
 gatatcgggt cggagttag 19  
  
 <210> 208  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 208  
  
 tatcgggttcg gagttagat 19  
  
 <210> 209  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 209  
  
 gtagaggata ttggtttgga 20  
  
 <210> 210  
 <211> 20

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 210  
  
 gaggatattg gtttggagtt 20  
  
 <210> 211  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 211  
  
 atattgggtt ggagttagat ta 22  
  
 <210> 212  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 212  
  
 gatattgggtt tggagttaga tta 23  
  
 <210> 213  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 213  
  
 atatcgaacg ggatttagag 20  
  
 <210> 214  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 214  
  
 ttttttaa atcgaacggg a 21  
  
 <210> 215  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 215  
 ttaaatatcg aacgggattt ag 22  
 <210> 216  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 216  
 tttaaatatc gaacgggatt ta 22  
 <210> 217  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 217  
 atattgaatg ggatttagag tt 22  
 <210> 218  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 218  
 taaatattga atgggattta gag 23  
 <210> 219  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 219  
 ttaaatatattg aatgggattt agag 24  
 <210> 220  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 220

ttttttttaa tattgaatgg gatt

24

<210> 221

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 221

gggagttcgc gggat

15

<210> 222

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 222

ggagttcgcg ggattt

16

<210> 223

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 223

gagttcgcgg gattttt

17

<210> 224

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 224

gagttcgcgg gatttttt

18

<210> 225

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 225

gggagtttgt gggattt

17

<210> 226  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 226

gggagtttgt gggatttt

18

<210> 227  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 227

ggagtttgtg ggattttttt

19

<210> 228  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 228

ggagtttgtg ggatttttta

20

<210> 229  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 229

gagtttcgtc gtcgtagtt

19

<210> 230  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 230

tggagttttg ttgtttag

19

<210> 231  
<211> 21

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 231  
  
 ttggagtttt gttgtttag t 21  
  
 <210> 232  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 232  
  
 ggtttttcgt ttatttcgag 20  
  
 <210> 233  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 233  
  
 gtttttcgtt tatttcgaga t 21  
  
 <210> 234  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 234  
  
 aggtttttcg tttatttcga g 21  
  
 <210> 235  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
 <400> 235  
  
 gtttttcgtt tatttcgaga tt 22  
  
 <210> 236  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 236

ggttttttgt ttattttgag a

21

<210> 237  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 237

ggttttttgt ttattttgag at

22

<210> 238  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 238

aggttttttg tttattttga ga

22

<210> 239  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 239

gtaggttttt tgttttatttt gag

23

<210> 240  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 240

attcgggacg ggggt

15

<210> 241  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 241

gattcgggac ggggg

15

<210> 242

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 242

agattcggga cgggg

15

<210> 243

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 243

gagattcggg acggg

15

<210> 244

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 244

gatttgggat ggggggtt

17

<210> 245

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 245

agatttggga tgggggt

17

<210> 246

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 246

gagatttggg atggggg

17



<210> 247  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 247

gatttgggat gggggttt

18

<210> 248  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 248

atggtatttt cgcggggt

18

<210> 249  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 249

atggtatttt tgtgggggt

19

<210> 250  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 250

gatggtattt ttgtgggggt

20

<210> 251  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 251

ttttcgogag gtgttta

17

<210> 252  
<211> 18

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 252

ttttcgcgag gtgtttat

18

<210> 253  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 253

tttttcgcga ggtgttta

18

<210> 254  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 254

tttttcgcga ggtgtttat

19

<210> 255  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 255

gttttttgtg aggtgtttat

20

<210> 256  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 256

ttttttgtga ggtgtttatt t

21

<210> 257  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 257  
 gttttttgtg aggtgtttat t 21  
 <210> 258  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 258  
 gttttttgtg aggtgtttat tt 22  
 <210> 259  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 259  
 aaacgagggg gcgttag 17  
 <210> 260  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 260  
 aaaacgaggg agcgtaa 17  
 <210> 261  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 261  
 taaaacgagg gagcggtt 17  
 <210> 262  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 262

taaaacgagg gagcgtta

18

<210> 263

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 263

aaatgagggga gtgttagg

18

<210> 264

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 264

aaatgagggga gtgttagga

19

<210> 265

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 265

aaaatgaggg agtgtagg

19

<210> 266

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 266

tgtaaaatga gggagtgtt

19

<210> 267

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 267

ggtcgtagt ttttcgtga

20

<210> 268  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 268

ggttgtagt tttttgtgta

20

<210> 269  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 269

ggttgtagt tttttgtgta a

21

<210> 270  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 270

tggttgtagt tttttgtgt a

21

<210> 271  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 271

ggttgtagt tttttgtgta at

22

<210> 272  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 272

cccactaaac atacccttat tc

22

<210> 273  
<211> 19

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
<400> 273

atttgggaaa gagggaaag

19

<210> 274  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
<400> 274

taaaaactct aaaccccatc c

21

<210> 275  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
<400> 275

agtaaatagt gggtgagtta tgaa

24

<210> 276  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
<400> 276

gaaaaacctc taaaaactac tctcc

25

<210> 277  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
  
<400> 277

taaggggaga ggaggagttt

20

<210> 278  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 278

accaattctc aatcatctct tt

22

<210> 279  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 279

aaggtttttag ggaagagtgt tt

22

<210> 280  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 280

accttttcct atcacaaaaa taa

23

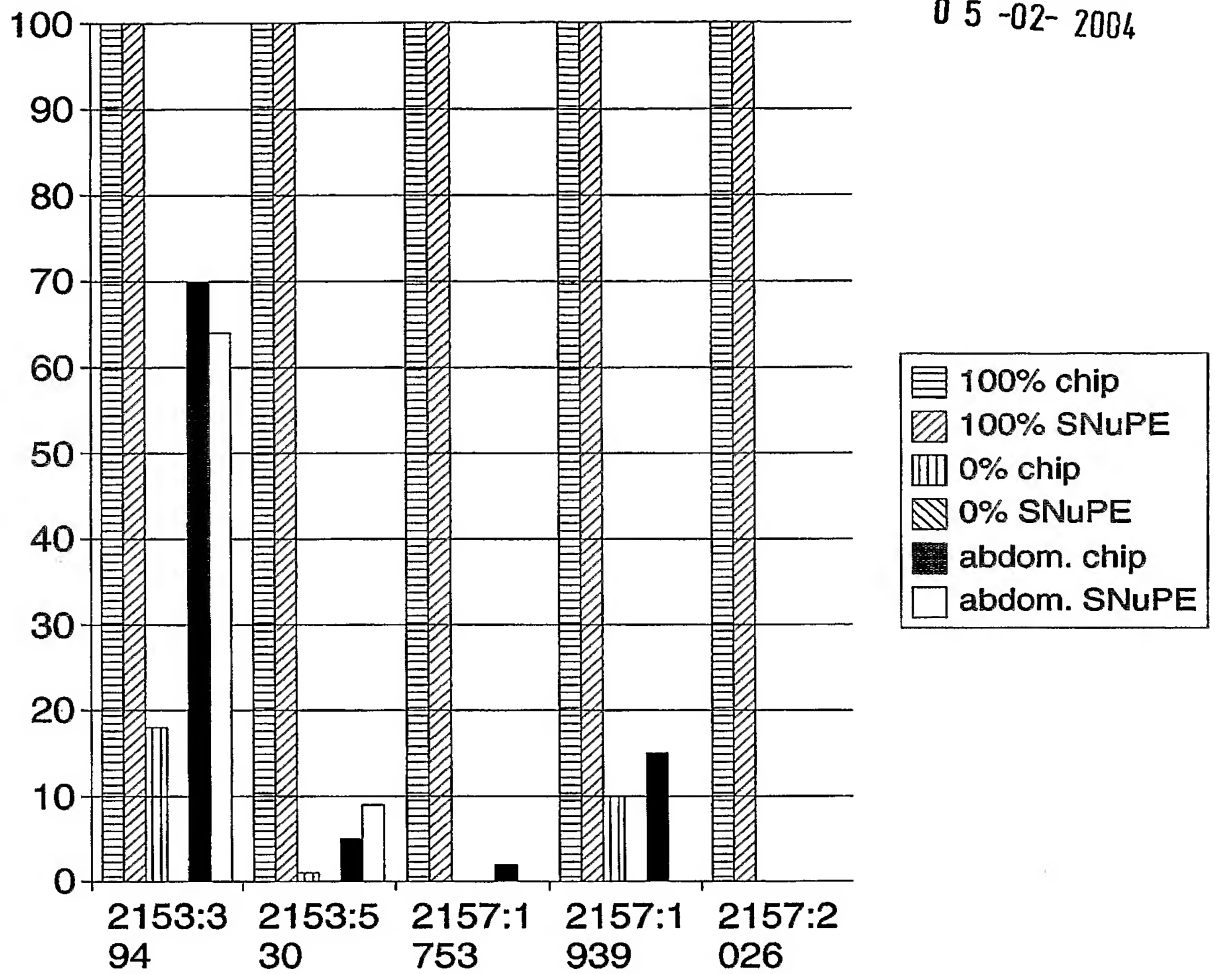


Abb. 1



